

Versuche mit cancerogenen Mitteln bei kurzlebigen Fischarten

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Manfred Ermer

aus

Nürnberg

1960

Lelipzig 1970

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1968

Dekan: Universitätsprofessor Dr. W. Haupt

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. W. Wunder

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. H. Remmert

Sonderdruck aus: Zoologischer Anzeiger, Bd.184, Heft 3/4

Aus der Teichwirtschaftlichen Untersuchungsstelle am Zoologischen Institut der Universität
Erlangen-Nürnberg
(Leiter: Prof. Dr. W. WUNDER)

Versuche mit cancerogenen Mitteln bei kurzlebigen Fischarten

VON

MANFRED ERMER¹

Mit 11 Abbildungen und 1 Tabelle

(Eingegangen am 2. Mai 1969)

Einleitung

Die Krebsforschung nimmt heute eine zentrale Stellung in der experimentellen Biologie ein. Da es sich beim Krebsproblem in erster Linie um ein zelluläres Problem handelt, erklärt sich seine allgemeinbiologische Bedeutung. Ein wichtiges Hilfsmittel der experimentellen Krebsforschung stellen die cancerogenen Stoffe dar. Dabei handelt es sich um verschiedene chemische bzw. physikalische Noxen, die im Tierversuch — zum Teil auch beim Menschen — Krebs hervorrufen können. Ihre Zahl beträgt zur Zeit etwas über 500; und es ist anzunehmen, daß sie noch weiter ansteigen wird (nach GRAFFI und BIELKA 1959).

Im Jahre 1914 gelang es den japanischen Forschern YAMAGIWA und ISCHIKAWA (1914) durch mehrmonatiges Bepinseln mit Teer am Kaninchenohr Hautkrebs hervorzurufen. Seit dieser Zeit sind eine unübersehbare Anzahl von Arbeiten, die Versuche mit Cancerogenen bei den verschiedensten Tierarten beschrieben, veröffentlicht worden. Bei vielen Versuchen, die zur Feststellung der krebsauslösenden Wirkung dieser Stoffe führten, dienten häufig Ratten und Mäuse als Versuchstiere. Diese besitzen aber bereits eine relativ hohe natürliche Krebsrate und bringen somit einen großen Unsicherheitsfaktor in die experimentelle Geschwulstforschung. Tumoren finden sich zwar bei vielen, hinsichtlich der Organisationshöhe weitauseinanderliegenden Tierarten; doch findet sich im Auftreten spontaner Geschwulste bei den Säugetieren, ganz besonders bei Ratten und Mäusen, ein ausgeprägtes Maximum. In der Wirbeltierreihe dürfte es daher von besonderem Interesse sein, wie sich die phylogenetisch niedrigste Stufe, der Fisch, in Hinsicht auf das Krebsproblem verhält.

¹ Dipl.-Biol. Dr. Manfred Ermer, 8510 Bislohe, Espanstraße 59.

Daß auch bei Fischen Krebs vorkommen kann, wissen wir aus Naturfunden. Die erste Beschreibung eines Fischtumors verdanken wir CRISP (1854). Zusammenfassend wurde zum ersten Mal über Geschwülste bei Fischen von PLEHN (1906, 1909 und 1910) berichtet. Neuere Zusammenfassungen wurden von dem Amerikaner SCHLUMBERGER im Jahre 1948 (zusammen mit LUCKÉ) und 1958 veröffentlicht. Bei vielen Fischarten ist Krebs recht selten. So hatte WUNDER (1962) nach einer Beobachtungszeit von über 30 Jahren nur einen einzigen Karpfen mit einer wirklichen Geschwulst (Melanofibrom) gefunden.

Klammert man die genetischen Versuche aus, wie sie z. B. von ANDERS (1965) bei Zahnkarpfen durchgeführt wurden, so ist bei Fischen auf dem Gebiet der experimentellen Krebsforschung wenig getan worden. Neben den Versuchen der amerikanischen Forscher HALVER (1962) und SOLOMON (1965), die Cancerogene dem Kunstfutter für Forellen beimengten, wurden von WUNDER und seinen Schülern Versuche mit cancerogenen Stoffen bei Fischen durchgeführt. Die Versuche von WUNDER (1960 und 1963) zeigen, daß der Karpfen gegen Implantate, die bei Ratten und Mäusen cancerogen wirken, praktisch keine Reaktion während der Versuchszeit von einem halben Jahr aufweist. Da nach BAUER (1963) ein deutlicher Zusammenhang zwischen Krebsauslösung und dem Alter besteht, dürfte in den schon erwähnten Versuchen die Lebenserwartung der Fische ein hemmender Faktor gewesen sein. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit mit kurzlebigen Fischarten gearbeitet werden.

Material und Methode

Es wurden Versuche mit cancerogenen Stoffen beim Stüchling, Bitterling und Karpfen durchgeführt. Die Stüchlinge für diese Versuche stammten teilweise aus dem Einzugsgebiet der Ruhr, teilweise aus dem Maingebiet in der Nähe von Coburg. Nach der Nomenklatur von MÜNZING (1959 und 1964) handelt es sich dabei um die Unterart: *Gasterosteus aculeatus f. leiurus*, die höchstens 3 Knochenschilder auf jeder Seite besitzt und damit eine ideale Möglichkeit bietet, Cancerogene auf die Haut durch Bepinselung bzw. Tropfung aufzutragen. Der zweite Vorteil, den der Stüchling bietet, liegt in seiner kurzen Lebenserwartung, die nach WUNDER (1930) und BAUCH (1963) 3 Jahre beträgt. Danach ist der Stüchling ein kurzlebiger Fisch und für cancerogene Versuche gut geeignet. Für alle Versuche wurden Fische verwendet, die sich im dritten Lebensjahr befanden. Neben dem Altersfaktor wurde auf folgende einheitliche Versuchsbedingungen geachtet: Länge 6,8–7,4 cm, Höhe 1,6–1,8 cm, Gewicht 3,9–4,3 g.

Ein zweiter Süßwasserfisch, der sich für cancerogene Versuche anbot, ist der Bitterling (*Rhodeus amarus* Bloch). Seine Lebenserwartung wird von BAUCH (1963) mit 5 Jahren angegeben. Die Versuchsfische, die sich im vierten und fünften Lebensjahr befanden, stammten teilweise aus der Umgebung von Erlangen, teils aus einer Fischzuchtanstalt in der Nähe von München. Ihre Durchschnittswerte waren: Länge 5,8–6,6 cm, Höhe 1,9–2,2 cm, Gewicht 4,4–4,9 g.

Neben diesen beiden kurzlebigen Fischarten wurden für Kontrollversuche auch Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) verwendet, die sich im zweiten Lebensjahr befanden und aus der Teichwirtschaft Riedl (Neumarkt/Opf.) stammten. Durchschnittswerte: Länge 8,9–9,7 cm, Höhe 2,9–3,3 cm, Gewicht 17–20 g.

Die Versuche wurden im Aquarium des Zoologischen Instituts Erlangen während der Jahre 1964 bis 1967 durchgeführt. Die Fische wurden in Versuchsbecken gehalten, deren Wasser durchlüftet und gefiltert wurde. Dabei lag der Sauerstoffgehalt zwischen 90–100%; die Durchschnittstemperatur betrug 16,6 °C, der pH lag bei 7,9 und das SBV bei 2,3. Die Versuchstiere wurden mit Lebendfutter ernährt; vorwiegend mit Tubifex. Die auf diese Weise gehaltenen Fische wurden mit folgenden Cancerogenen behandelt; dabei kamen auch für die Lösungsmittel nur reinste Chemikalien zur Anwendung: Buttergelb (4-Dimethylaminoazobenzol) der E. Merck AG, 3,4-Benzpyren der Firma Th. Schuchardt, 20-Methylcholanthren der FLUKA AG.

Alle Versuche wurden mit Kontrollfischen durchgeführt; insgesamt wurden etwa 200 Stüchlinge, 100 Bitterlinge und 40 K₁ verwendet. Die cancerogenen Mittel wurden durch Bepinselung, Injektion, Verfütterung und Einpflanzung zur Anwendung gebracht.

Die Anwendungsarten sind in den einzelnen Abschnitten der Versuchsreihen genauer beschrieben.

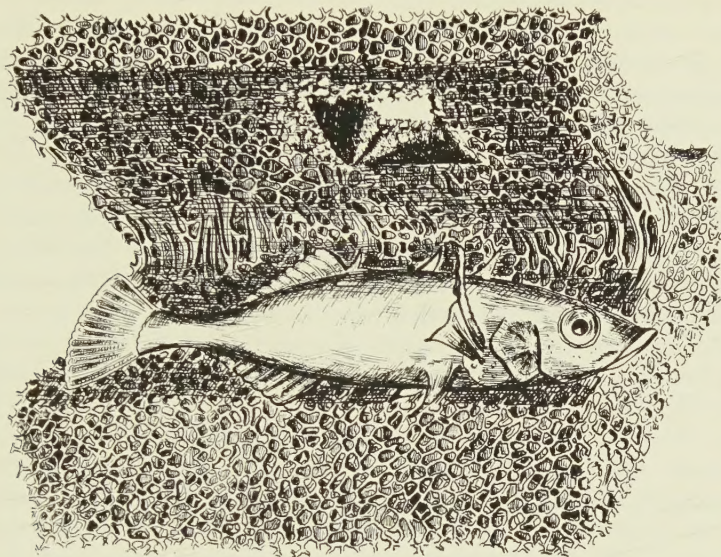


Abb. 1. Einbetten eines Versuchsfisches in einem aufgeschnittenen Schwammblock. Durch den ausgeschnittenen Teil der oberen Platte kann der Fisch bequem bepinselt bzw. injiziert werden

Für die Bepinselungs- und Injektionsversuche wurde der in Abb. 1 dargestellte Kunststoffschwamm benutzt. SCHARRE (1928) hatte als erster den angefeuchteten Gummischwamm als ideale Unterlage bei Fischoperationen erkannt, WUNDER (1931) benutzte für seine Experimente an Bitterlingen diesen Schwamm mit einer Klappe. Ein ähnlich gestalteter Schwamm wurde auch für die vorliegenden Versuche verwendet. Hierzu wurde ein Schwammblock (etwa $10 \times 5 \times 2,5$ cm) in der Mitte so eingeschnitten, daß der obere Teil als federnder Deckel aufklappbar ist. In diesen aufklappbaren Teil wird ein etwa 2 cm^2 großes Loch geschnitten. Durch diese herausgeschnittene Fläche kann nun die Haut des Fisches bequem bepinselt, bzw. in die Leibeshöhle injiziert werden.

Die Fische in den Hauptversuchsgruppen wurden etwa 6 Monate behandelt. Zur genaueren Untersuchung wurden die Fische danach in 10%igem Formalin fixiert und nach 2 Tagen in 6%iges Formalin überführt. Für die zytologischen Untersuchungen wurden Teile der behandelten Fische auch mit Flemmingscher Flüssigkeit fixiert. Organ- und Gewebestücke der Versuchsfische wurden neben Teilen von unbehandelten Tieren in Paraffin (Schmelzpunkt $57-60^\circ \text{C}$) der Firma Merck eingebettet, um zur histologischen Auswertung Schnitte anzufertigen. Zum Schneiden stand ein Schlittenmikrotom der Firma Jung zur Verfügung, mit dem Schnitte zwischen 5 und 10μ angefertigt wurden. Bei den histologischen Arbeiten wurde im wesentlichen nach der mikroskopischen Technik, wie sie ROMEIS (1948) vorgeschlagen hat, verfahren. Zur Auswertung der Schnitte diente ein Leitz-Mikroskop, das eine Vergrößerung bis zu 1000fach erlaubte.

Versuchsreihen

I. Einpflanzung von Buttergelb

Buttergelb ist ein organotropes Cancerogen, d. h., es wirkt nur auf die Leber der Versuchstiere, wie durch DRUCKREY (1948) u. a. Autoren festgestellt

wurde. In der vorliegenden Versuchsgruppe, die nur Stichlinge umfaßte, sollte untersucht werden, ob Buttergelb außer durch Verfütterung auch auf anderen Wegen auf die Leber einwirken kann.

Dazu wurden 2 Versuchsgruppen angesetzt: Einpflanzung in die Muskulatur und in die Leibeshöhle. Bei der Operation ist eine Betäubung nötig. Als Betäubungsmittel diente Urethan, das nach dem von WUNDER (1936) beschriebenen Verfahren angewendet wurde. Eingepflanzt wurde dabei jeweils 0,1 g Buttergelb.

Zur Einpflanzung in die Muskulatur wurden 5 Stichlinge verwendet. Vor dem Einbringen des Implantats wurde mit dem Skalpell ein Kanal geschaffen. Die Lage der Operationswunde ist aus Abb. 2 zu ersehen. Die Schnittwunde heilte immer von beiden Enden her zu. Nach einiger Zeit wurde das als Nähmaterial benutzte Catgut abgestoßen bzw. es wurde nach dem ersten Wundverschluß herausgezogen. Bei 4 Stichlingen wurde das Buttergelb nach einem Zeitraum von 25–35 Tagen nach der Operation durch den noch nicht völlig verheilten Wundkanal nach außen abgestoßen. War dieser Vorgang beendet, heilte die Wunde völlig normal zu. Bei einem Versuchsfisch, bei dem die Wunde schon völlig geschlossen war, brach das eingepflanzte Buttergelb vor der ehemaligen Schnittstelle nach etwa 2 Monaten durch. Kurze Zeit, nachdem sich die neue Wunde entzündet hatte, ging dieses Versuchstier ein.

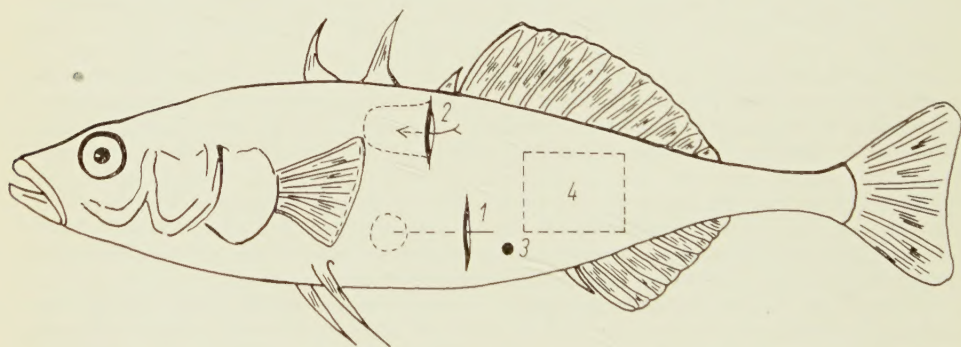


Abb. 2. Schematische Lage der Behandlungsstellen beim Stichling: 1 = Ort der Einpflanzung in die Leibeshöhle, 2 = Ort der Einpflanzung in die Muskulatur, 3 = Stelle der Injektionsversuche, 4 = Bepinselungsfläche

Durch die folgende histologische Untersuchung konnte weder an der Leber noch an der Einpflanzungsstelle eine Veränderung im Sinne der Karzinogenese festgestellt werden. In ähnlicher Weise wurde Buttergelb in die Leibeshöhle eingepflanzt. Dabei wurde senkrecht zur Körperachse ein Schnitt auf der linken Seite des Fisches in der Leibesmitte geführt (vgl. Punkt 1 in Abb. 2). Der Schnitt wurde so groß gewählt, daß die einzupflanzende Buttergelbmeng mit einer Pinzette bequem nach vorne in die Lebergegend geschoben werden konnte. Danach wurde die Wunde mit einer einfachen Naht aus Catgut wieder geschlossen.

Auch diese Versuchsgruppe umfaßte 5 Fische. Bei 3 Stichlingen heilte die Schnittwunde normal zu. Das Buttergelb lag nach einer Versuchszeit von 4 Monaten reaktionslos in der Leibeshöhle. Bei 2 Versuchsfischen brach das Buttergelb ebenfalls weit vor der ursprünglichen Operationsstelle nach außen. Die Durchbruchstelle entzündete sich. Auch bei dieser Versuchsgruppe konnten histologisch an der Leber keine karzinomatösen Veränderungen nachgewiesen werden.

Die aufgetretenen Reaktionen bei der Einpflanzung, sei es das Abstoßen der Fremdkörper, oder seien es die darauffolgenden Entzündungen, liegen im Rahmen ähnlicher Ergebnisse bei anderen Fischarten. Derartige Untersuchungen führte WUNDER (1960) an Karpfen und ROSENBAUER (1965) an Regenbogenforellen durch. Weiterhin bestätigen diese an Stichlingen durchgeführten Versuche, daß Buttergelb als organotropes Cancerogen nur durch Abbaustufen, wie sie bei der Verfütterung entstehen, auf die Leber von Versuchstieren krebserzeugend wirkt.

II. Verfütterung von Buttergelb

1948 veröffentlichte DRUCKREY zusammen mit KÜPFMÜLLER seine Ergebnisse über die quantitativen Zusammenhänge zwischen Buttergelbverfütterung und Hepatomentstehung, die er durch Untersuchungen an 700 Ratten gewonnen hatte. Die Hauptfrage war nun, ob sich die von DRUCKREY erzielten Ergebnisse auch auf Fische anwenden lassen.

Durchgeführt wurden die Versuche in 3 Gruppen zu je 10 Stichlingen und 3 Gruppen mit jeweils 10 Bitterlingen. Verfüttert wurde das Buttergelb zusammen mit Tubifex und Alginat. Hierzu wurden 10 g Tubifex, 0,2 g Buttergelb und 1 g Alginat mit etwas Wasser in einem Becherglas zusammen verrührt. Diese Mischung läßt man etwa $\frac{1}{4}$ Stunde quellen und erhält dann einen dicken, orangerot gefärbten Nahrungsbrei, den man in kleinen Klumpen verfüttert. Dabei lag die tägliche Dosis an 4-Dimethylaminoazobenzol pro Versuchsfisch bei etwa 10 mg. Aus jeder Gruppe wurde in Abständen von 3–4 Wochen ein Fisch entnommen und dessen Leber fixiert.

1. Verfütterung beim Stichling

Bei der normalen Leberzelle des Stichlings wurden eine Kern-Plasma-Relation (KPR) von 0,03 und eine Mitosehäufigkeit (MH) von etwa 10% ermittelt (diese und die folgenden Werte stellen einen Mittelwert aus 200 Zellen dar).

Nach 6 Wochen Buttergelbverfütterung, das entspricht etwa 400 mg pro Fisch, ist eine deutliche Kernvergrößerung bei den Leberzellen festzustellen. Dies drückt sich auch in der KPR von 0,14 aus. Auch die MH stieg auf 15%. Nach 12 Wochen, das sind rund 850 mg Buttergelb pro Versuchsfisch, stieg die KPR bis auf 0,19 und die MH auf 22% an. Es sind deutliche Kernpolymorphismen zu erkennen (vgl. Abb. 3). Die bisher festgestellten Veränderungen sind

durchaus vergleichbar mit den analogen Versuchen an Ratten. Allerdings lassen sich ähnliche Störungen der KPR und der Zellteilungen bei Ratten in wesentlich kürzerer Zeit und mit weit geringeren Mengen Buttergelb erzielen.

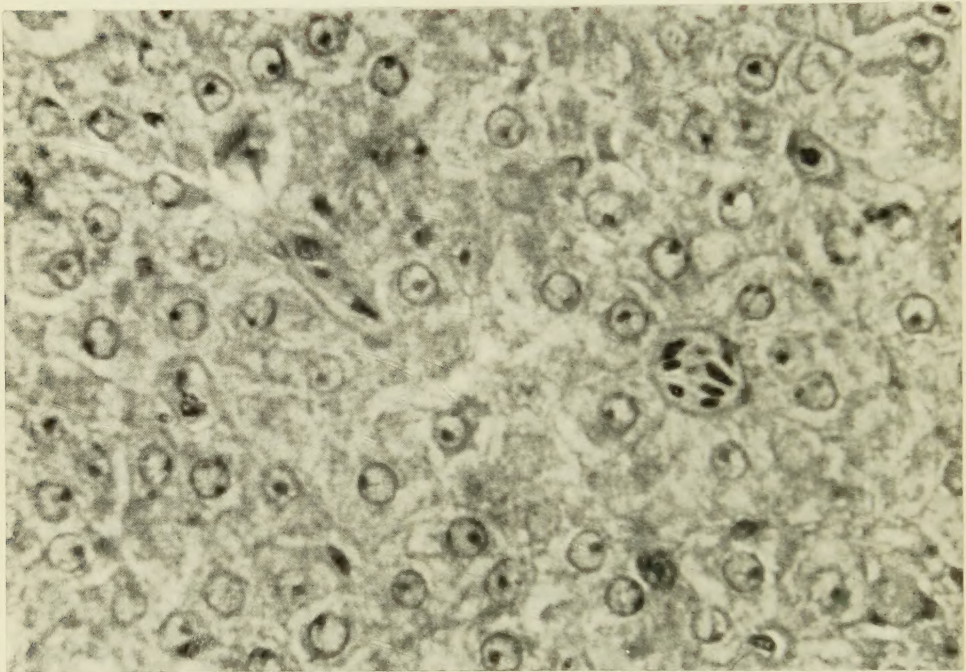


Abb. 3. Kernvergrößerung, Kernunregelmäßigkeiten und die Mitosehäufigkeit nach 3 Monaten Buttergelbverfütterung (Vergr. etwa 1300fach; HE-Färbung)

Die bisher beschriebenen histologischen Ergebnisse lassen sich im Sinne von DRUCKREY (1948) als präcanceröses Stadium bezeichnen. DRUCKREY spricht weiterhin von der „Kernunruhe“, die als einziges Phänomen bei der Krebsentstehung aller krebserregenden Stoffe und Strahlen in gleicher Weise voranzugehen scheint. HAMPEL (1956) untersuchte die Verschiebung der Kern-Plasma-Relation bei der Buttergelbverfütterung an Ratten genauer und erhielt Werte, die bei 0,3 lagen. BAYREUTHER (1952) stellte bei der Karzinogenese erhebliche Störungen der Mitosehäufigkeit und des Chromosomenbestandes fest.

Diese Vorstufen konnten bei den vorliegenden Versuchen in ansteigender Linie bis etwa 3 Monate verfolgt werden. Während es bei den analogen Rattenversuchen im Anschluß an diese Vorstufen zur Tumorausbildung, deren Rate bei 80–100% liegt, kommt, konnte bei den Versuchen am Stichling in keinem Fall auch bei noch so hoher Dosis an Buttergelb eine maligne Entartung der Leber festgestellt werden. Die Verfütterung von 4-Dimethylaminoazobenzol wurde bis zu 7 Monaten fortgesetzt; was einer Dosis von 2000 mg Buttergelb pro Versuchsfisch entspricht. Zwar blieb eine gewisse Kernpolymor-

phie bestehen; doch es kam zu keiner Gewebsentartung im Sinne der Karzinogenese. Als einzige sichere Störung konnte bei fast allen Versuchsfischen eine Entartung des Fettstoffwechsels der Art festgestellt werden, wie sie MAIER (1961) und WUNDER (1967 a, b) für die Leber des Karpfens beschrieben haben. In Abb. 4 ist zu erkennen, wie große Teile des Leberparenchyms durch Fettgewebe ersetzt sind.

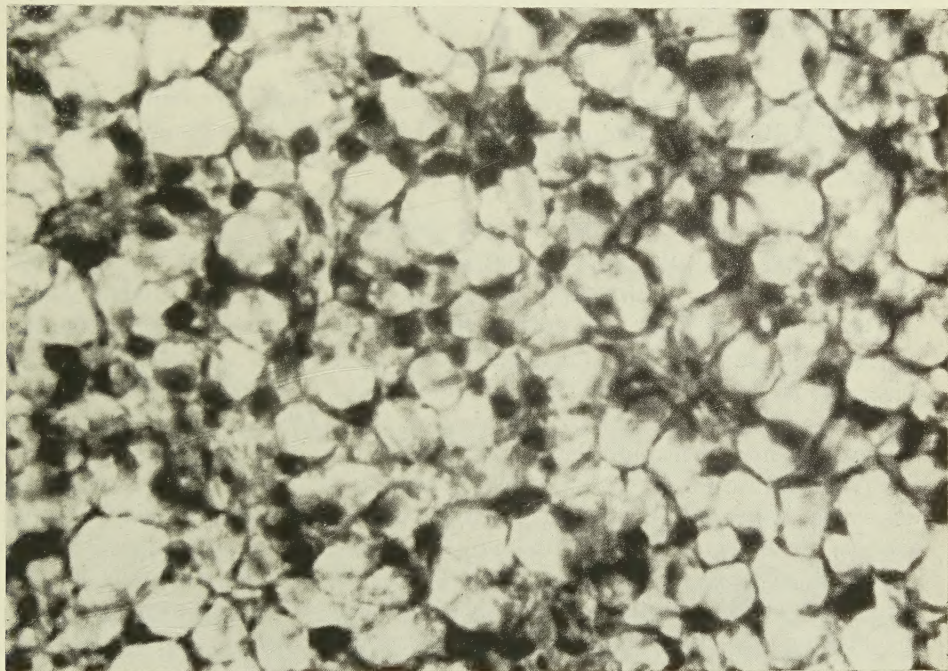


Abb. 4. Verfettetes Lebergewebe, wie es bei fast allen Versuchsfischen auftrat, die lange mit Buttergelb gefüttert wurden. Hier handelt es sich um eine Versuchszeit von 7 Monaten (Vergr. 1200fach; HE-Färbung)

2. Verfütterung beim Bitterling

Bei rund 200 Messungen wurden für die normale Zelle der Bitterlingsleber eine KPR von rund 0,04 und eine MH von 8–9% ermittelt. Bei den Fütterungsversuchen konnte beim Bitterling die kontinuierliche Verschiebung der KPR, wie sie beim Stichling erzielt worden war, nicht festgestellt werden. Zwar beobachtet man auch an der Bitterlingsleber eine leichte Zunahme der MH. Sie liegt nach 12 Wochen oder rund 800 mg Buttergelb pro Versuchsfisch bei etwa 12–14%; doch erreicht sie nicht die hohen Werte der Stichlingsversuche.

Auch diese Versuchsreihe wurde bis zu 7 Monaten durchgeführt. Dabei betrug die aufgenommene Buttergelbmenge pro Bitterling etwa 2000 mg. Trotz dieser hohen Menge an 4-Dimethylaminoazobenzol kam es zu keiner karzino-

matösen Veränderung. Wie bei den analogen Versuchen beim Stichling läßt sich auch beim Bitterling nach dieser Versuchszeit eine Umwandlung des Leberparenchyms in Fettgewebe feststellen.

Zusammenfassend kann über die Fütterungsversuche gesagt werden, daß auch mit einer noch so großen Dosis an Buttergelb sowohl beim Stichling als auch beim Bitterling keine Lebertumoren entstehen. Nach kanzerösen Vorstufen, die beim Stichling viel ausgeprägter als beim Bitterling waren, konnte bei beiden Fischarten eine starke Verfettung der Leber festgestellt werden.

III. Injektionsversuche

Für diese Versuchsart wurden 2 cancerogene Stoffe verwendet, das fettlösliche 3,4-Benzpyren und das wasserlösliche Diaethylnitrosamin; diese wurden nur bei Stichlingen angewendet.

1. Injektion von 3,4-Benzpyren

Über die Löslichkeit von 3,4-Benzpyren finden sich bei RAUEN (1964) folgende Angaben: „... löslich in Aceton, Benzol, Toluol, Xylol; wenig löslich in Alkohol und Glycerin; nicht löslich in Wasser.“ In den folgenden Versuchen wurde ermittelt, welches Lösungsmittel von den Fischen am besten vertragen wird. Die Werte sind in Abb. 5 zusammengefaßt. Daraus ist ersichtlich, daß Glycerin am besten abschnitt. Es wurde eine 1%ige Lösung von 3,4-Benzpyren in Glycerin hergestellt und davon jeweils 0,1 ml injiziert. Dabei wurden von den Versuchsfischen 10 Injektionen vertragen; das entspricht einer Gesamtdosis von 10 mg 3,4-Benzpyren. Nach der 10. Injektion wurde die Versuchsgruppe, die aus 5 Stichlingen bestand, 4 Monate im Aquarium gehalten. Bei der anschließenden Untersuchung zeigte sich, daß bei allen Fischen das 3,4-Benzpyren reaktionslos in der Leibeshöhle abgelagert worden war. Auch histologisch konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

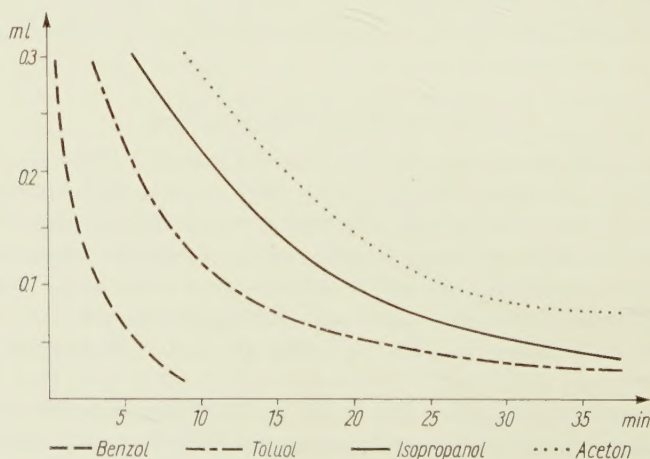


Abb. 5. Letalzeit der verschiedenen Lösungsmittel in Abhängigkeit von der injizierten Menge

2. Injektion von Diaethylnitrosamin

Diaethylnitrosamin (DAENA) ist ein wasserlösliches Cancerogen; damit entfällt auch die Suche nach einem geeigneten Lösungsmittel. DRUCKREY u. a. Autoren (1963) gelang es mit DAENA bei Ratten bis zu 100% Lebertumoren zu erzeugen. In den vorliegenden Versuchen sollte untersucht werden, ob DAENA bei kurzlebigen Fischen ähnliche Schädigungen setzt. Dazu wurde zunächst festgestellt, wie die einzelnen Konzentrationsstufen von DAENA (jeweils 0.1 ml) auf Stichlinge wirken. In Abb. 6 ist die Letalzeit in Abhängigkeit

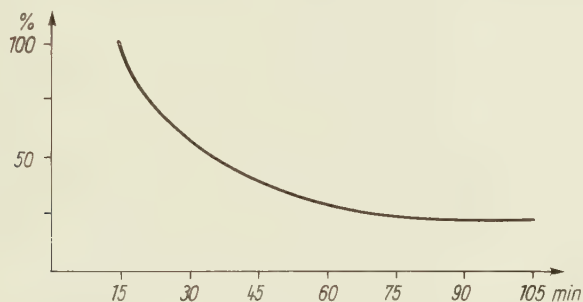


Abb. 6. Abhängigkeit der Letalzeit von der Diaethylnitrosamin-Konzentration

von der Konzentration graphisch dargestellt. Bei Injektion von 0.1 ml einer 12.5%igen Lösung ist damit die Grenze der Letaldosis erreicht. Es wurden 2 Versuchsgruppen angesetzt: Injektion von einer 1%igen und einer 5%igen Lösung von DAENA in Aqua dest. Jede Versuchsgruppe umfaßte 4 Stichlinge, die bis zu 6 Monaten mit DAENA-Lösungen gespritzt wurden. Es konnte jedoch weder an der Injektionsstelle noch an der Leber histologisch eine karzinomatöse Veränderung nachgewiesen werden. Festgestellt wurden nur ausgedehnte Zellnekrosen um die Injektionsstelle. Dabei wurde bei der 5%igen Lösung nach 3 Wochen das Gewebe nekrotisch, während bei der 1%igen Lösung solche Gewebsauflösungen nach rund 5 Wochen auftreten.

IV. Bepinselungsversuche

Diese Versuchsreihe wurde an Stichlingen, Bitterlingen und Karpfen durchgeführt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die einzelnen Versuchsgruppen.

1. Vorversuche

Zunächst mußte untersucht werden, welches Lösungsmittel von der Haut der Versuchsfische am besten vertragen wurde. Nach RAUEN (1964) kommen vom Standpunkt der Löslichkeit für 3,4-Benzpyren und 20-Methylcholanthren nur Aceton oder Benzol in Frage. Dabei zeigte sich schon bei der makroskopischen Untersuchung der Vorversuche, die mit den beiden Lösungsmitteln durchgeführt wurden, daß für längere Versuche nur Aceton geeignet ist. Mit Benzol wurden sowohl von den Stichlingen als auch von den Bitterlingen nur

Stoff	Konzentr. in %	Fischart	Anzahl der Versuchsfische	Dauer der Versuche
Benzol	100	Stichling	9	2 und 4 W.
Benzol	100	Bitterling	9	2 und 4 W.
Aceton	100	Stichling	12	3 und 6 M.
Aceton	100	Bitterling	12	3 und 6 M.
Aceton	100	Karpfen	6	4 M.
3,4-Benzpyren	1	Stichling	30	3 bis 7 M.
3,4-Benzpyren	1	Bitterling	20	3 bis 7 M.
3,4-Benzpyren	1	Karpfen	10	3 bis 4 M.
20-Methylchol.	1	Stichling	20	3 bis 6 M.
20-Methylchol.	1	Bitterling	20	3 bis 6 M.
20-Methylchol.	1	Karpfen	10	3 bis 4 M.

(W. = Wochen; M. = Monate)

8–16 Bepinselungen vertragen. Dabei löste sich meist schon nach der dritten Bepinselung die Epidermis auf. Das führte bei weiteren Benzolauftragungen zu Wunden, die bis in die Muskulatur reichten.

Aceton erwies sich dagegen als sehr brauchbar: sowohl in Vorversuchen als auch bei Kontrolluntersuchungen, die bis zu 6 Monaten durchgeführt wurden, zeigte sich, daß Aceton von der Fischhaut auch bei längerer Anwendung gut vertragen wird. Dieser Befund deckt sich mit analogen Versuchen bei Mäusen, wie sie von GRAFFI-BIELKA (1959) durchgeführt worden waren; diese Autoren konnten feststellen, daß Aceton als Lösungsmittel selbst von der empfindlichen Mäusehaut am reaktionslosesten vertragen wird und sich damit die reine Kohlenwasserstoffwirkung am besten erfassen läßt.

Die Bepinselungsversuche wurden, nachdem das geeignetste Lösungsmittel festgestellt worden war, mit einer 1%igen Lösung von 3,4-Benzpyren bzw. 20-Methylcholanthren in Aceton durchgeführt. Die dabei angewandte Methode soll hier genauer dargelegt werden: Die Versuchsfische wurden in den schon an anderer Stelle beschriebenen Gummischwamm so eingelegt, daß die Bauchseite in der Nähe des Schwanzes bequem behandelt werden konnte (vgl. Abb. 1, 2 und 7). Diese Stelle wird vorher mit Fließpapier leicht abgetrocknet. Nach einer Trocknungszeit von etwa 1 Minute wird die Acetonlösung mit Aquarell-Aufsteckpinseln, deren Fassungsvermögen auf 0,1 ml zugeschnitten worden war, vorsichtig aufgetupft bzw. aufgetropft. Diese Behandlung muß sehr genau erfolgen. Man darf die Lösung nicht mit kräftigem Druck aufpinseln, weil sonst das Epithel mechanisch geschädigt wird und neoplastische Bildungen zerstört werden können. Wenn man sich dieser Methode bedient, bleibt das Cancerogen dank der raschen Verdunstung des Acetons als dünner Film auf der Haut zurück.

2. Versuche beim Stichling

Um die Veränderungen genauer beschreiben zu können, soll zunächst kurz das histologische Bild der normalen Stichlingshaut an der Bepinselungsstelle

erläutert werden. In Abb. 8 ist zu erkennen, wie auf die Muskulaturbündel straffes Bindegewebe, lockeres Bindegewebe und Epidermis folgen. Dabei beträgt bei der unbehandelten Haut die Dicke des Bindegewebes 80–100 μ , die der Epidermis etwa 20 μ . Die Epidermis eines Stichlings wird aus 4 Lagen von Zellen gebildet, zwischen denen relativ große und zahlreiche Schleimzellen eingebettet sind.

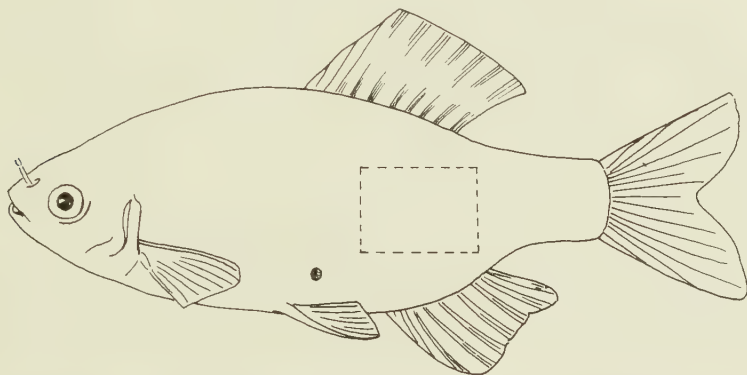


Abb. 7. Schematische Lage der Behandlungsstelle beim Bitterling

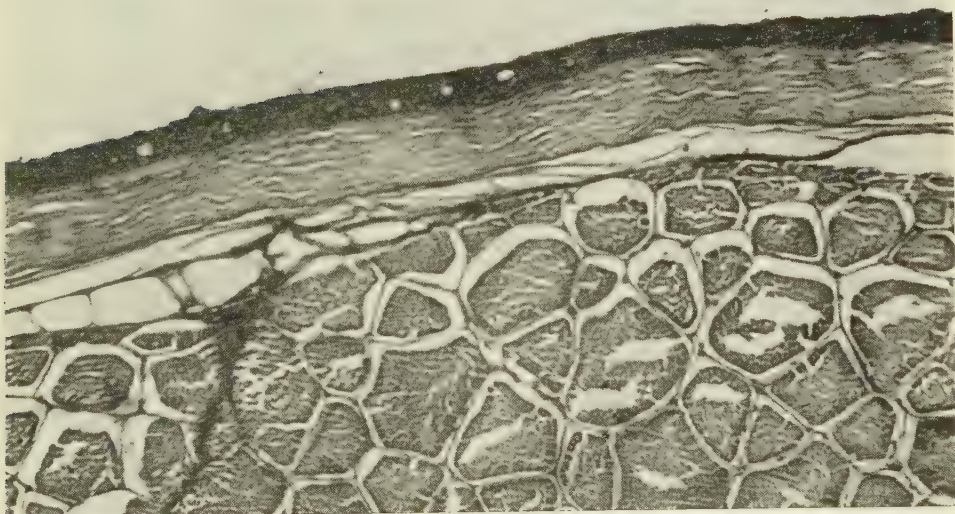


Abb. 8. Übersicht der normalen Stichlingshaut. Auf die Muskulaturbündel folgen von unten nach oben Bindegewebe und Epidermis (Vergr. 220fach; HE-Färbung)

a) mit 3,4-Benzpyren

Die Dosis pro Bepinselung betrug 0,5 mg 3,4-Benzpyren; damit wurden die Versuchsfische zweimal in der Woche behandelt. Nach einer Behandlungs-

zeit von 4 Wochen, das entspricht 4 mg 3,4-Benzpyren pro Versuchsfisch, ist bereits eine deutliche Verdickung der Epidermis zu erkennen. Sie besteht aus 5–7 Zellagen und weist eine durchschnittliche Dicke von $30\ \mu$ auf. Nach 8 Wochen bzw. 8 mg 3,4-Benzpyren ist die Epidermis, die nun aus 8–9 Zellagen besteht, auf rund $50\ \mu$ verdickt. Nach weiteren 4 Wochen, insgesamt also nach 3 Monaten, ist die verdickte Epidermis bei manchen Versuchsfischen in Wucherungen, die einen Durchmesser bis zu $400\ \mu$ besitzen, entartet (vgl. Abb. 9).

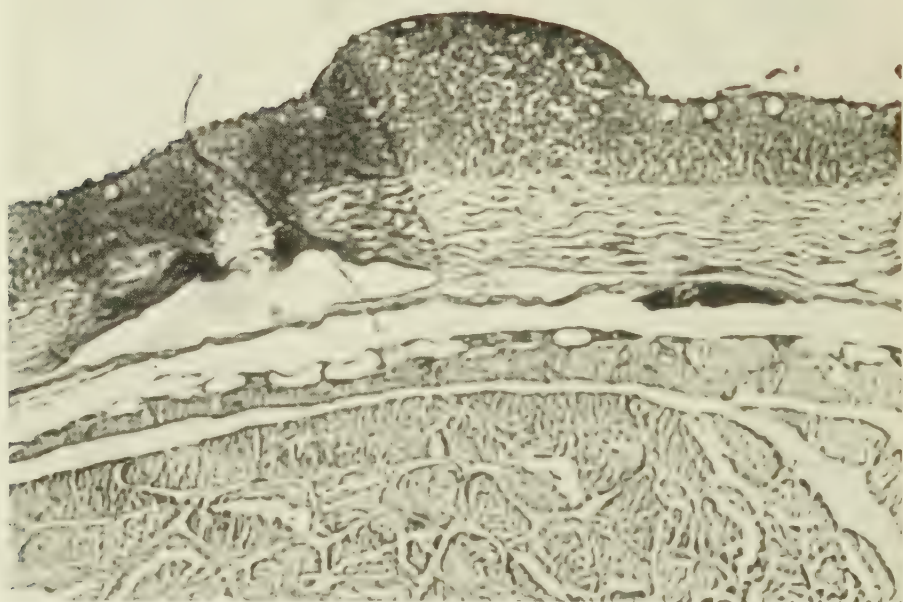


Abb. 9. Histologisches Bild einer Sticlingshaut, die 3 Monate mit 3,4-Benzpyren behandelt wurde. Man erkennt deutlich die verdickte Epidermis, die an einer Stelle in eine Wucherung entartet ist (Vergr. etwa 220fach; HE-Färbung)

Nach einer Applikation von 22 mg, das entspricht einer Bepinselung von 5 Monaten, sind bei fast allen Fischen diese Wucherungen auch makroskopisch gut zu erkennen, da sich ihre Größe nun im mm-Bereich bewegt. Histologisch sind nun deutlich, wie auch Abb. 10 zeigt, ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphien ersichtlich.

Diese Versuchsreihe wurde bis zu 7 Monaten durchgeführt. Dabei konnten bei 83% der Fische diese Wucherungen erzielt werden. In dieser Versuchszeit kommen auf 1 Sticliling rund 30 mg 3,4-Benzpyren. Trotz dieser im Verhältnis zu analogen Mäuse- und Rattenversuchen großen Menge eines Cancerogens konnte damit eine Umwandlung der Wucherungen an der Haut des

Stichlings in ein bösartiges Tumorstadium nicht erzielt werden. Da es sich also um ein gutartiges Tumorstadium handelt, wurde für die Wucherungen der Name Epitheliom gewählt.

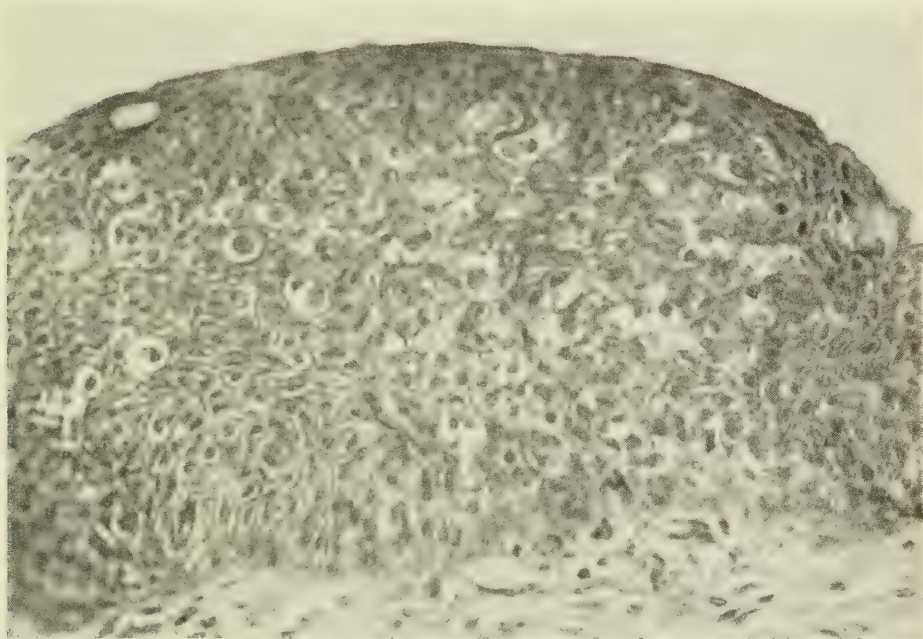


Abb. 10. Ausschnittvergrößerung. Es ist deutlich das atypische Epithelgewebe, das sich durch Kernpolymorphie auszeichnet, zu erkennen (Vergr. etwa 1200fach; HE-Färbung)

b) mit 20-Methylcholanthren

Das 20-Methylcholanthren stellt nach BIELKA (1966) in der experimentellen Geschwulsterzeugung das wirksamste Cancerogen dar, das wir z. Z. kennen. Die Versuche mit dieser Kohlenwasserstoffverbindung wurden in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt. Die Ergebnisse der Bepinselung mit 20-Methylcholanthren gleichen denen von 3,4-Benzpyren weitgehend. Es lassen sich aber auch rein äußerlich Unterschiede erkennen. Einerseits können bei einem höheren Prozentsatz der Versuchstiere Epitheliome erzeugt werden (im vorliegenden Fall bei 90% der behandelten Stichlinge), zum anderen lassen sich mit 20-Methylcholanthren die Zeiten bis zum Entstehen der einzelnen Epitheliomstadien um durchschnittlich 1 Woche verkürzen.

Neben diesen Unterschieden konnten auch bei der histologischen Untersuchung der mit 20-Methylcholanthren behandelten Fische gegenüber den Versuchen mit 3,4-Benzpyren festgestellt werden. Dabei zeigten sich ähnliche Erscheinungen, wie sie WUNDER (1962) bei einem Karpfen beschrieben hat. An einem Melanofibrom konnten Kernzerfall, Pigmentdegeneration und das Abstoßen dieser Pigmentbrocken beobachtet werden. Bei den vorliegenden Versuchen mit 20-Methylcholanthren konnten häufig diese Pigmentdegenerationen beobachtet werden.

3. Versuche beim Bitterling

Die Haut des Bitterlings eignet sich wegen ihrer Beschuppung nicht ganz so gut für Bepinselungsversuche wie die des Stichlings. Dieser Nachteil wird aber einigermaßen dadurch wieder ausgeglichen, daß sich die Schuppen des Bitterlings sehr leicht aus ihren Taschen lösen. Bei den vorliegenden war meist schon nach der zweiten Bepinselung die behandelte Fläche, deren Lage in Abb. 7 schematisch dargestellt ist, unbeschuppt. Im weiteren Verlauf bildet sich an der Stelle, wo sich vorher die Schuppe befand, ein Epidermishäutchen. Dabei beträgt bei der unbehandelten Haut die Dicke des Bindegewebes 35 bis 40 μ , die der regenerierten Epidermis rund 15 μ ; diese wird aus 3—4 Zelllagen gebildet.

a) Versuch mit 3,4-Benzpyren

Die Dosis pro Bepinselung betrug auch hier 0,5 mg 3,4-Benzpyren in Acetonlösung. Nach einer Behandlungszeit von 1 Monat ist eine signifikante Epidermisverdickung zu erkennen; sie besteht aus 5—6 Zellagen und weist eine durchschnittliche Dicke von 20 μ auf. Nach einem weiteren Monat ist die Verdickung auf 25—30 μ angewachsen. Die Epidermis wird nun aus 6—8 Zelllagen gebildet. Nach weiteren 8 Wochen, insgesamt also nach 4 Monaten Behandlungszeit, was einer Dosis von 16 mg entspricht, ist die verdickte Epidermis mancher Versuchsfische in Wucherungen, die einen Durchmesser bis zu 250 μ besitzen, entartet. Diese Versuchsserie wurde bis zu 6 Monaten durchgeführt. Dadurch konnten bei rund 45% der Versuchsfische die beschriebenen Wucherungen erzielt werden. In dieser Versuchszeit betrug die Dosis, die auf einen Bitterling kam, etwa 25 mg 3,4-Benzpyren. Wie bei den bereits geschilderten Stichlingsversuchen konnte auch bei den Bitterlingen durch diese relativ hohe Cancerogendosis eine maligne Entartung bzw. eine Metastasierung der Epitheliome nicht erzielt werden.

b) Versuch mit 20-Methylholanthren

Wie bei den Stichlingen wurden auch bei den Bitterlingen Bepinselungsversuche mit 20-Methylholanthren durchgeführt. Die Ergebnisse ähneln denen der Stichlingsversuche weitgehend. Wie bei diesen lassen sich auch bei den 20-Methylholanthrenversuchen beim Bitterling gegenüber denen mit 3,4-Benzpyren Unterschiede erkennen. Erstens konnten bei einem höheren Prozentsatz der Versuchstiere Epitheliome erzeugt werden; es waren rund 60% der behandelten Bitterlinge. Und zum zweiten lassen sich durch 20-Methylholanthren im Vergleich mit 3,4-Benzpyren die Zeiten der einzelnen Epitheliomstadien deutlich verkürzen. Benötigt man z. B. zur Erzeugung der ersten Epithelwucherungen 16 mg Benzpyren, die in 16—17 Wochen appliziert worden waren, so kann man mit der gleichen Menge 20-Methylholanthren dieses Stadium der Epithelwucherung bereits nach 14—15 Wochen erzielen. Mit der gleichen Cancerogenmenge können also auch bei den Bitterlingsversuchen durch 20-Methylholanthren die Entstehungszeiten der einzelnen Epitheliomstadien um etwa 1 Woche verkürzt werden.

Histologisch konnte bei dieser Versuchsreihe am Bitterling ebenfalls die schon bei den Stichlingsversuchen beschriebene Pigmentdegeneration durch 20-Methylcholanthren festgestellt werden. Doch war hier das Abstoßen der degenerierten Pigmentbrocken nicht so häufig zu beobachten, wie bei den Stichlingen.

4. Versuche beim Karpfen

Die bisher beschriebenen Versuche beim Stichling und Bitterling waren an relativ kurzlebigen Fischarten durchgeführt worden. Wie bereits dargelegt, wird die durchschnittliche Lebenserwartung in der Literatur für den Stichling mit 3 Jahren und für den Bitterling mit 5 Jahren angegeben. Bei der gegebenen Problemstellung der Versuche erschien es nun besonders reizvoll, auch Kontrolluntersuchungen mit einer langlebigen Fischart durchzuführen. Dafür bot sich als geeigneter Fisch der Karpfen an. Einmal können Cancerogene bequem aufgetragen werden; zum anderen liegt seine Lebenserwartung relativ hoch.

Hohe Altersangaben von 100 und mehr Jahren dürften wohl in das Reich der Fabel gehören. Doch wird ein Alter von 18–20 Jahren bei *Cyprinus c.*, der dann eine Länge von etwa 60 cm aufweist, keine Seltenheit sein.

Auch beim Karpfen wurden sowohl mit 3,4-Benzpyren als auch mit 20-Methylcholanthren Versuche durchgeführt. In beiden Fällen bestand eine Versuchsgruppe aus je 10 Fischen. Mit den beiden Cancerogenen wurden Bepinselungsversuche beim Karpfen in der schon beschriebenen Weise durchgeführt, wobei die Dosis pro Bepinselung 0,5 mg 3,4-Benzpyren bzw. 20-Methylcholanthren betrug. Obwohl sich die Versuche über einen Zeitraum bis zu 4 Monaten erstreckten, konnten im Gegensatz zu den Bepinselungen beim Stichling und Bitterling beim Karpfen keinerlei Veränderungen der behandelten Haut erzielt werden. Vergleicht man die histologischen Schnitte der Haut von der behandelten Stelle mit der von der unbepinselten Seite des Fisches, so kann man zu keinem Zeitpunkt der Versuchsdauer deutliche Unterschiede erkennen.

Mit der gewählten Versuchsanordnung und innerhalb der angewandten Versuchszeit konnten beim Karpfen weder mit 3,4-Benzpyren noch mit 20-Methylcholanthren Veränderungen der Haut im Sinne der Karzinogenese erzielt werden.

Diskussion der Ergebnisse

Überblickt man die Ergebnisse der Bepinselungs- bzw. Tropfungsversuche, so können zunächst folgende Tatsachen festgestellt werden. Bei kurzlebigen Fischarten können durch Bepinselungen der Haut mit cancerogenen Stoffen Epitheliome erzeugt werden. Kontrollversuche dagegen, die beim Karpfen — einer langlebigen Fischart — durchgeführt wurden, führten zu keiner karzinomatösen Hautveränderung. Dieses zwar negative Ergebnis bestätigt ähnliche Versuchsergebnisse, wie sie WUNDER und ROSENBAUER (1965) beschrieben hatten. Weiterhin ist es eine bekannte Tatsache der experimentellen Krebsforschung, daß bereits innerhalb der gleichen Gattung die cancerogene Wir-

kung einiger Stoffe recht problematisch ist. Es sei an dieser Stelle an die unterschiedlichen Resultate von Versuchen an weißen Inzuchtmäusen und natürlich aufgewachsenen grauen Mäusen erinnert. Aus diesen Gründen kann es also nicht verwundern, daß nicht jede Fischart auf cancerogene Stoffe gleich reagiert.

Von der Problemstellung der vorliegenden Arbeit ausgehend, kann man feststellen, daß sich auch bei Fischen, der phylogenetisch niedrigsten Stufe der Wirbeltiere, an der Haut durch Cancerogene Veränderungen im Sinne der Karzinogenese erzeugen lassen. Innerhalb der durchschnittlichen Versuchszeit von 4—6 Monaten, in der bei einem großen Teil der behandelten Stichlinge und Bitterlinge Epitheliome entstanden, kam auf einen Versuchsfisch eine Dosis von etwa 20—30 mg 3,4-Benzpyren bzw. 20-Methylcholanthren. Zu analogen Versuchen an Ratten und Mäusen ist dies eine relativ hohe Menge von stark cancerogen wirkenden Kohlenwasserstoffverbindungen. Obwohl eine Umwandlung der gutartigen Wucherungen der Fischhaut in ein bösartiges Tumorstadium, d. h. eine Metastasierung, nicht erreicht wurde, lassen sich die erzielten Ergebnisse durchaus mit den bereits zitierten Mäuseversuchen ver-

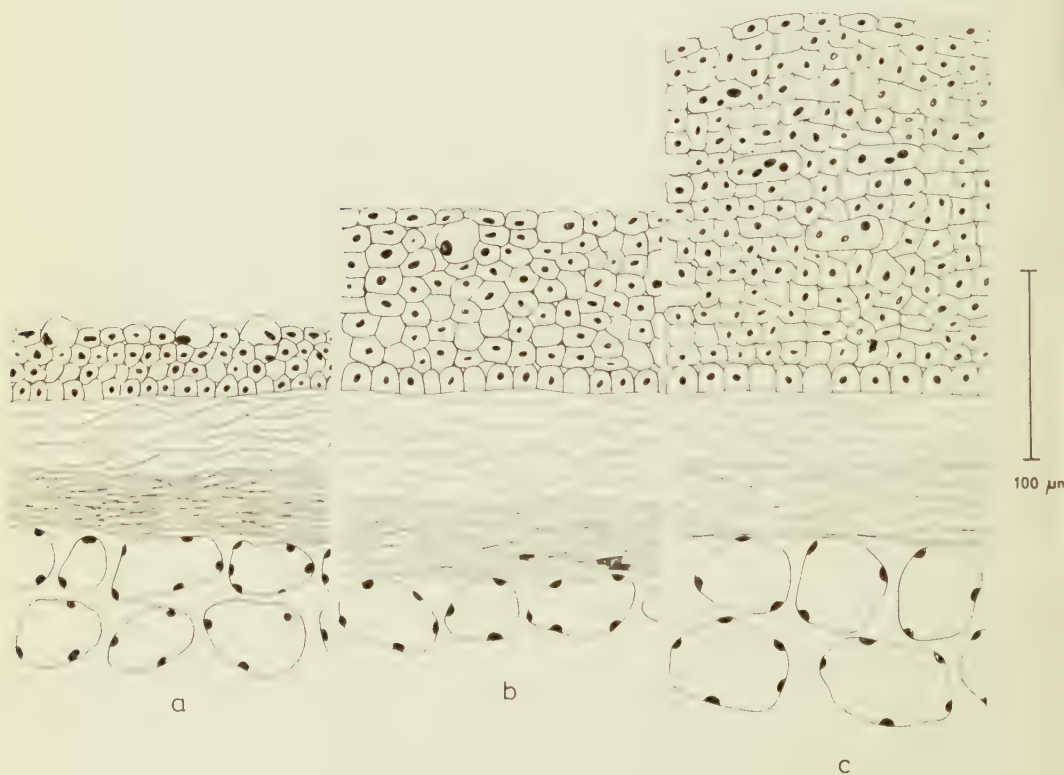


Abb. 41. Halbschematische Darstellung einzelner Stadien der Epitheliomentstehung (nach histologischen Präparaten gezeichnet). a) normale Epidermis, b) verdickte Epidermis nach etwa 6 Wochen, c) beginnende Wucherung nach etwa 3 Monaten Behandlungzeit

gleichen. Betrachtet man die Stadien der erzeugten Epitheliome, wie sie in Abb. 11 halbschematisch nach histologischen Präparaten gezeichnet wurden, so erkennt man, daß außer der Malignisierung die Befunde der vorliegenden Versuche durchaus den analogen Versuchen bei anderen Wirbeltierklassen entsprechen. Nach GRAFFI-BIELKA (1959) S. 193: „Grundsätzlich läßt sich durch Einwirkung eines cancerogenen Reizes der experimentell hervorgerufene Geschwulstbildungsvorgang vom morphologischen Standpunkt in drei Phasen einteilen, und zwar in 1. die histologischen Veränderungen im Gebiet der späteren Geschwulstbildung, die der mikroskopisch und makroskopisch nachweisbaren Tumorbildung vorausgehen, 2. das Stadium noch gutartiger Geschwülste und 3. das Stadium der bösartigen Geschwülste.“

Vergleicht man weiterhin die Versuchsergebnisse mit der Lebenserwartung der verwendeten Fischarten, so scheint ein Zusammenhang zwischen der Lebenserwartung und der Epitheliomerzeugung zu bestehen. Wie bereits beschrieben, liegt die Lebenserwartung beim Stichling bei 3 Jahren, beim Bitterling bei 5 Jahren und beim Karpfen bei 20 und mehr Jahren. In den vorliegenden Experimenten konnten mit 3,4-Benzpyren bei Stichlingen an 83%, bei Bitterlingen an rund 45% und bei Karpfen an 0% der verwendeten Tiere Epitheliome hervorgerufen werden. Für 20-Methylcholanthren lauten die %-Zahlen: Stichling rund 90, Bitterling rund 60 und Karpfen ebenfalls 0. Diese Versuchszahlen bestätigen die Vermutung, wie sie auch BAUER (1963) beschrieben hat, daß zwischen Krebsauslösung und dem Alter ein deutlicher Zusammenhang besteht.

Die Unterschiede der %-Zahlen, Entstehungszeiten der einzelnen Epitheliomstadien und der histologisch-zytologischen Befunde zwischen den Versuchen mit 3,4-Benzpyren und den Bepinselungen mit 20-Methylcholanthren sind in der Wirksamkeit der beiden Cancerogene begründet. Denn 20-Methylcholanthren ist um ein vielfaches wirksamer als 3,4-Benzpyren, und nach BIELKA (1966) stellt es sogar das wirksamste Cancerogen dar, das wir zur Zeit kennen.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Mit den gegebenen Versuchsbedingungen und der beschriebenen Methode konnten an den beiden kurzlebigen Süßwasserfischen *Gasterosteus aculeatus* und *Rhodeus amarus* Epitheliome erzeugt werden; beim langlebigen *Cyprinus carpio* war das nicht möglich. Durch die Versuchsergebnisse erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß zwischen der Lebenserwartung der verwendeten Fischarten und der Epitheliomerzeugung ein deutlicher Zusammenhang besteht.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Tumoren finden sich bei vielen hinsichtlich der Organisationshöhe weit auseinander liegenden Tierarten. Es zeigt sich allerdings im Auftreten spontaner Geschwülste bei Säugetieren, ganz besonders bei Ratten und Mäusen, ein ausgeprägtes Maximum. Daß auch bei Fischen — der phylogenetisch niedrigsten Stufe der Wirbeltiere — Krebs vorkommen kann, ist aus zahlreichen Naturfunden bekannt.

Die vorliegende Arbeit wurde 1964—1967 im Zoologischen Institut Erlangen durchgeführt. An den kurzlebigen Süßwasserfischen *Gasterosteus aculeatus* und *Rhodeus amarus* wurden folgende Cancerogene angewandt: 4-Dimethylaminoazobenzol, Diaethylnitrosamin, 3,4-Benzpyren und 20-Methylcholanthren.

Bei der Einpflanzung von Buttergelb in die Muskulatur und in die Leibeshöhle des Stiehlinges konnten ähnliche Ergebnisse, wie sie WUNDER (1960) für den Karpfen und ROSENBauer (1965) für Forellen erhalten hatten, erzielt werden: es kam zu Entzündungen und Abstoßung der eingepflanzten Fremdkörper.

Durch Fütterung von Buttergelb konnten nach 3 Monaten an der Leber präcanceröse Stadien, wie Kernpolymorphien und Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, festgestellt werden. Dabei waren diese Stadien beim Stiehling ausgeprägter als beim Bitterling. Bei längerer Buttergelbfütterung zeigte sich bei beiden Fischarten eine starke Verfettung der Leber. Eine Hepatom-entstehung konnte dagegen auch bei einer Dosis von 2000 mg Buttergelb mit den angewandten Untersuchungsmethoden nicht festgestellt werden.

Durch Injektionen von einer 3,4-Benzpyren-Suspension in Glycerin und einer wäßrigen Lösung von Diaethylnitrosamin konnten in der gegebenen Versuchszeit bei Stiehlingen keine karzinomatösen Veränderungen erzielt werden. Bei den DAENA-Versuchen traten um die Injektionsstelle ausgedehnte Zellnekrosen auf.

Mit den gegebenen Versuchsbedingungen und der beschriebenen Methode konnten an den beiden kurzlebigen Süßwasserfischen *Gasterosteus aculeatus* und *Rhodeus amarus* Epitheliome erzeugt werden: beim langlebigen *Cyprinus carpio* war das nicht möglich. Mit 3,4-Benzpyren entstanden bei 83% der Stiehlinge und bei 45% der Bitterlinge die beschriebenen Hautwucherungen. Für 20-Methylcholanthren lauten die Zahlen: Stiehling 90% und Bitterling 60%. Weiterhin konnten Unterschiede der %-Zahlen, Entstehungszeiten der einzelnen Epitheliomstadien und der histologischen Befunde zwischen den Versuchen mit 3,4-Benzpyren und den Bepinselungen mit 20-Methylcholanthren festgestellt werden. Durch die Versuchsergebnisse erscheint es als sehr nahe liegend, daß zwischen der Lebenserwartung der verwendeten Fischarten und der Epitheliomerzeugung ein deutlicher Zusammenhang besteht.

Schrifttum

- ANDERS, F.: Aminosäuregehalt, Farbenmanifestation und Tumorbildung bei lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae). Verhandl. der Deutschen Zoolog. Gesellschaft in Kiel. Zool. Anz. Suppl. Bd. 28 (1965) 102—109.
- BAUCH, G.: Die einheimischen Süßwasserfische, Melsungen. Neumann-Neudamm 1963.
- BAUER, K. H.: Das Krebsproblem. Berlin/Göttingen/Heidelberg. Springer-Verlag 1963.
- BAYREUTHER, K.: Chromosomenbestand der Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. Z. f. Naturforschg. 7b (1952) 554—557.
- CRISP, E.: Large Fungoid Tumor in a Carp. Transactions Path. Soc. London 5 (1854) 347 bis 348.

- DRUCKREY, H., u. K. KÜPFMÜLLER: Quantitative Analyse der Krebsentstehung. Z. f. Naturforschg. **3 b** (1948) 254—266.
- , A. SCHILDBACH, D. SCHMÄHL, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC: Quantitative Analyse der karcinogenen Wirkung von Diaethylnitrosamin. Arzneim.-Forschg. **13** (1963) 841—851.
- GRAFFI, A., u. H. BIELKA: Probleme der experimentellen Krebsforschung. In GERSCH (Hrsg.): Probleme der Biologie Bd. 6. Akad. Verl. Ges. Leipzig 1959.
- , —, D. BIERWOLF u. T. SCHRAMM: Erzeugung von Krankheitszuständen durch das Experiment. Teil 12: Tumoren I. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Vol. 16. Berlin-Heidelberg-New York. Springer-Verlag 1966.
- HALVER, J. E.: Induction of Rainbow Trout Hepatoma with Chemicals Carcinogens. Progress in Sport Fishery. Research. U. S. Dept. of Interior, Circ. **160** (1962) 38—47.
- MAIER, CH.: Untersuchung über die Verfettung der Leber des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.). Z. f. Fischerei, S. D. aus **10**, H. 1—3 (1961) 29—68.
- MÜNZING, J.: Biologie, Variabilität und Genetik von *Gasterosteus aculeatus* L. (Pisces). Untersuchungen im Elbgebiet. Int. Revue ges. Hydrobiol. **44**, H. 3 (1959) 317—382.
- Variabilität und Verbreitung von *Gasterosteus aculeatus* L. (Pisces) in Europa. Verh. Ver. naturw. Heimatforschung Hamburg **36** (1964) 1—22.
- OTTO, H., W. WUNDER u. E. BOHNET: Peritonealtumoren an Kaltblütern. Frankfurter Z. f. Pathol. **72** (1963) 497—505.
- PLEHN, M.: Über Geschwulste bei Kaltblütern. Z. f. Krebsforschg. **4** (1906) 525—564.
- Über einige bei Fischen beobachtete Geschwüre und geschwulstähnliche Bildungen. Ber. d. bay. biol.-Vers.-Anstalt Mchn. **2** (1909) 55.
- Über Geschwulste bei niederen Wirbeltieren. Confer. Internat. Trav. du Cancer Paris 1910, S. 221—242.
- RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch. 1. Teil. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964.
- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München 1948.
- ROSENBAUER, D.: Einpflanzung von Fremdkörpern in Fische, durchgeführt an Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und Regenbogenforellen (*Salmo irideus* W. Gibb.). Zulassungsarbeit. Erlangen 1965.
- SCHARRER, E.: Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen. Z. f. Vergl. Physiol. **7** (1928) 1—38.
- SCHLUMBERGER, H. G., and B. LUCKÈ: Tumors of Fishes, Amphibians and Reptiles. Cancer Research **8** (1948) 657—754.
- Krankheiten der Fische, Amphibien und Reptilien. Pathol. d. Laboratoriumstiere **2** (1958) 714—761.
- SOLOMON, G.: Hepatic Changes in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fed Diets Containing Peanut, Cottonseed, and Soybean Meals. Amerik. J. of Veterinary Research, Vol. 26, No. 112 (1965) 764—770.
- WUNDER, W.: Experimentelle Untersuchungen am dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus* L.) während der Laichzeit. Z. f. Morph. und Ökol. d. Tiere **16** (1930) 453 bis 498.
- Experimentelle Erzeugung des Hochzeitkleides am Bitterling (*Rhodeus amarus*) durch Einspritzung von Hormonen. Z. f. Vergl. Physiol. **13** (1931) 698—708.
- Physiologie der Süßwasserfische Mitteleuropas. Stuttgart 1936.
- Einpflanzung von Fremdkörpern aus Kunststoffen und anderem in die Muskulatur und in die Leibeshöhle von Fischen. Versuche an Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). Int. Revue ges. Hydrobiol. **45**, H. 2 (1960) 283—296.
- Eine Hautgeschwulst (Melanofibrom) beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). Verh. d. Deutsch. Zool. Ges. in Wien (1962) 633—640.
- Starke Verfettung der Leber bei großen Verkaufskarpfen. Arch. Fischereiwiss. **17**, H. 2 (1967 a) 114—121.
- Leberverfettung bei Verkaufskarpfen. Allg. Fischzeitg. **92**, Heft 7 (1967 b).
- YAMAGIVA, K., u. K. ISHIKAWA: Über die atypischen Epithelwucherungen. Gann **8**, H. 1 (1914) 11—15.

Lebenslauf

Am 8. Oktober 1939 wurde ich, Manfred Ermer, als einziges Kind des kaufm. Angestellten Franz Ermer und seiner Ehefrau Martha, geb. Eichinger, zu Nürnberg geboren. 1944 übersiedelten meine Eltern nach Pollanten (Kreis Beilngries/Opf.). Dort besuchte ich auch die ersten vier Klassen der Volksschule. Nach Beendigung der fünften Volksschulklasse in Beilngries/Opf. besuchte ich das Humanistische Gymnasium in Eichstätt/Bay. bis zur 5. Klasse. Kurz darauf - nachdem meine Eltern nach Nürnberg zurückgezogen waren - verstarb 1956 mein Vater.

Im Juli 1961 erwarb ich das Abitur am Neuen Humanistischen Gymnasium in Nürnberg und begann im WS 1961/62 mein Studium an der Universität Erlangen in den Fächern: Biologie, Chemie und Geographie. Seit dem 5. Semester arbeitete ich bei Herrn Prof. Dr. W. Wunder im Rahmen meiner Diplom- und Promotionsarbeit über cancerogene Stoffe bei Fischen. Während meines 12. Fachsemesters (SS 67) legte ich die Haupt-Diplom-Prüfung in den Fächern: Zoologie, Botanik, Organ. Chemie und Geographie ab. Im Herbst 1967 bestand ich das Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in Biologie, Chemie und Erdkunde.

Im Februar 1968 habe ich geheiratet. Z. Zt. bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der pharmazeutischen Industrie beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herrn Professoren: H. Behrens, O. Berninger, H.J. Bestmann, F. Birzer, K. Brodersen, E. Buchta, R. Fleckmann, K. Gauckler, W. Haupt, E. Haustein, F. Heller, G. Hesse, W. Kamlah, E. Kessler, A. Meuwesen, W. Neuhaus, G. Osche, E. Scheu, W.A. Schnitzer, J. Schwemmler, K. Seiler, H.J. Stammer, E. Virth, W. Wunder, R. Zocher.

